



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 5/08, C12M 3/04, G01N 1/06	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/53728 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 14. September 2000 (14.09.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00528 (22) Internationales Anmeldedatum: 18. Februar 2000 (18.02.00) (30) Prioritätsdaten: 199 12 798.0 10. März 1999 (10.03.99) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: JORDAN, Andreas [DE/DE]; Dahlemer Weg 63 A, D-14167 Berlin (DE). (74) Anwalt: WABLAT, Wolfgang; Potsdamer Chaussee 48, D-14129 Berlin (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CN, JP, KR, US, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	

(54) Title: METHOD FOR CULTIVATING CANCER CELLS FROM HUMAN TISSUE AND DEVICE FOR PREPARING TISSUE SAMPLES

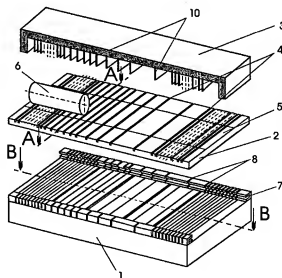
(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR KULTIVIERUNG VON KREBSZELLEN AUS HUMANGEWEBE UND VORRICHTUNG ZUR AUFBEREITUNG VON GEWEBEPROBEN

(57) Abstract

The invention relates to a method for cultivating cancer cells for scientific serial assays, wherein a tissue sample which is heterogeneous with respect to contaminants, normal cells and tumor cells is locally separated in a sequential-parallel splitting method. The locally separated sample segments are further split, wherein the tissue fragments and liquids of the tissue segments are separately placed in a given cell culture medium and grown under predetermined culture conditions. The invention also relates to a cell culture medium and a device for splitting the tissue samples into disc segments. The inventive method combined with the splitting device and the culture medium enables fast cultivation of cancer cells obtained from human tissue with a multiplication rate of 100 % in all types of tumors.

(57) Zusammenfassung

Bei einem Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen für naturwissenschaftliche Reihenuntersuchungen wird eine in bezug auf Kontaminanten, Normalzellen und Tumorzellen heterogene Gewebeprobe in einem sequentiell-parallelen Schneidvorgang örtlich aufgelöst. Die orts aufgelösten Probensegmente werden weiter geteilt, wobei die Gewebefragmente und -flüssigkeiten der Gewebeselemente separat in einem bestimmten Zellkulturmedium unter vorgegebenen Kulturbedingungen zum Wachstum gebracht werden. Es werden ein Zellkulturmedium sowie eine Vorrichtung zum Teilen der Gewebeprobe in Scheibensegmente angegeben. Mit dem Verfahren wird in Verbindung mit der Schneidvorrichtung und dem Kulturmedium bei allen Tumorarten eine schnelle Kultivierung von aus Humangewebe gewonnenen Krebszellen mit einer Angehrate von 100 % erreicht.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Beschreibung

5 **Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Humangewe-**
 be und Vorrichtung zur Aufbereitung von Gewebeprobe

10 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Kultivierung von
 Krebszellen aus Humangewebe für naturwissenschaftliche,
 vorzugsweise molekularbiologische und zellbiologische
 Reihenuntersuchungen sowie ein Zellkulturmedium zur
 Durchführung des Verfahrens und eine Vorrichtung zur Auf-
 arbeitung der Gewebeprobe.

15 Für molekularbiologische Untersuchungen, vor allem mit
 prädiktiver Intention, ist die Kultur von primären, aus
 Feinnadel- und Stanzbiopsien gewonnenem Zellmaterial von
 zentraler Bedeutung. Bei den bekannten Methoden ist je-
20 doch die „Angehrate“ der aus Humangewebe isolierten Zel-
 len sehr gering. Bei manchen Tumorarten ist eine Zellkul-
 tivierung bisher nicht gelungen. Diese Problematik ist
 zum einen dadurch begründet, daß die das Tumorgewebe um-
 gebenden Normalzellen und/oder die das Tumorgewebe infil-
25 trierenden Bindegewebszellen als erste wachsen und so die
 Tumorzellen, die für die Untersuchungen gewonnen werden
 sollen, überwachsen und am Wachstum hindern. Eine erfolg-
 reiche Kultivierung von Krebszellen wird darüber hinaus
 durch vielfältige Kontaminationen, insbesondere mit Bak-
30 terien oder Pilzen, verhindert.

35 Die bisher für die Kultivierung von Tumorzellen verwen-
 deten Zellkulturmedien, wie RPMI 1640, Basal Medium Eagle,
 ISCOVE's, Medium 199, Leibovitz L-15. u.a., sind nicht in
 der Lage, das Wachstum der Krebszellen in ausreichendem

Maße zu fördern bzw. das der Normalzellen und bakteriellen Kontaminanten zu verhindern. Der bisher übliche unkontrollierte Einsatz von Antibiotika wirkt zwar den negativen Einflüssen der Kontaminanten entgegen, behindert aber gleichzeitig das Wachstum der Tumorzellen.

Bei den bekannten Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen erfolgt die Aufbereitung der aus Feinnadel- oder Stanzbiopsien gewonnenen Gewebeproben durch eine mechanisch-enzymatische Gewebe-Disaggregation, bei der der heterogene, aus verschiedenen Schichten bestehende, die Gewebeprobe bildende Stanzzylinder durch eine Feinzerkleinerung als Ganzes in eine breiige Masse zerteilt und mit Hilfe von Enzymen in einzelne Zellen umgewandelt werden soll. Durch diese Feinzerkleinerung wird aber die heterogene Struktur der entnommenen Gewebeprobe zerstört und es erfolgt eine intensive Vermischung der Tumorzellen mit den Normalzellen und Kontaminanten. Zum einen wird die Vitalität der Tumorzellen durch die Feinzerkleinerung beeinträchtigt. Andererseits ist durch die Zerstörung der Heterogenität der Gewebeprobe der Probematerialbrei mit Normalzellen und Kontaminanten durchsetzt, so daß das Wachstum der Tumorzellen aus den oben genannten Gründen vermindert oder sogar vollständig verhindert wird. Bei dieser Art der mechanisch-enzymatischen Gewebe-Desaggregation des Gesamtmaterials sind Aussagen über die Struktur des Tumors nicht möglich.

Bei den bisher bekannten Verfahren zur Vermehrung und Reinigung des aus einer Gewebeprobe gewonnenen Tumormaterials wird die Zellvermehrung durch Transplantation des Tumormaterials auf eine Nacktmaus vorgenommen (Xenotransplantat). Bei diesem Verfahren können zwar Angehörten des transplantierten Tumorgewebes von 50 % und gele-

gentlich auch mehr erreicht werden, jedoch vergehen - je nach Tumorart und Eigenschaften - mehrere Wochen oder gar Monate, ehe sich eine Zellvermehrung in vivo einstellt. Aufgrund des erheblichen Aufwands und der Zeitdauer haben

5 Routinetests mit patientenindividuellen Primärzellen für eine Verlaufskontrolle und prädiktive Zwecke bisher nicht Eingang in die klinische Anwendung gefunden. Aufgrund der langwierigen und oftmals vergeblichen Versuche zur Kultivierung des vom Patienten entnommenen Gewebematerials

10 liegen die Testergebnisse viel zu spät vor, um in einem Routineverfahren aus den Versuchsergebnisse eine rechtzeitige Änderung des Therapieregimes vornehmen zu können. Neben dem hohen Zeitaufwand ist auch die erforderliche Durchführung von Tierversuchen und der hohe Kostenaufwand

15 nachteilig.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein von Tierversuchen unabhängiges Verfahren zur Kultivierung von

20 Krebszellen aus Humangewebeproben anzugeben, das in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum von wenigen Tagen eine sichere Vermehrung von Tumorzellen aus einer Gewebeprobe gewährleistet und reproduzierbare Aussagen über die Struktur und die Malignität des Tumors sowie Wachstums-

25 und Strukturänderungen oder therapeutische Effekte zulässt. Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht in der Bereitstellung einer auf dem Verfahren beruhenden Vorrichtung zur reproduzierbaren Aufbereitung von Gewebeproben sowie einem geeigneten Zellkulturmedium zur Vermehrung

30 von Krebszellen in vitro.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe mit einem Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen gemäß den Merkmalen des Patentanspruchs I gelöst.

35

Der Grundgedanke der Erfindung besteht dabei darin, daß die Gewebeprobe in einem sequentiell-parallelen Schneidvorgang in eine Mehrzahl separater Gewebesegmente aufgeteilt wird und somit die auf der Grundlage von 5 Kontaminanten, Normalzellen und Tumorzellen heterogene Gewebeprobe bzw. deren Heterogenität örtlich aufgelöst wird. Die Gewebesegmente werden dann jeweils separat weiter zerkleinert und die so gebildeten kleinen, separierten Gewebefragmente und -flüssigkeiten sowie die bei der 10 sequentiell-parallelen Teilung der Gewebeprobe entstandene, ebenfalls jeweils separat gewonnene Gewebeflüssigkeit werden in einem spezifischen Zellkulturmedium und unter ausgewählten Kulturbedingungen kultiviert. Durch die örtliche 15 Auflösung der Gewebeprobe werden die Einflüsse von in dieser vorhandenen Normalzellen, die bei üblicher - mechanischer oder enzymatischer - Aufbereitung der Gewebeprobe ein Überwachsen der Tumorzellen bewirken, ausgeschaltet oder zurückgedrängt. Gleichermaßen wird das Ausmaß von Kontaminationen, wie Pilze 20 oder Bakterien, wesentlich reduziert bzw. erforderliche Antibiotika, die die Vermehrung von Tumorzellen bekanntermaßen stören, können sparsam und gezielt eingesetzt werden, ohne sich auf die Krebszellenkultivierung negativ 25 auszuwirken.

Das vorgeschlagene Verfahren wird in weiterer Ausbildung der Erfindung durch ein für sehr geringe Gewebemengen geeignetes Zellkulturmedium in der im Anspruch 8 wiedergegebenen Zusammensetzung sowie durch die im Anspruch 5 30 hinsichtlich der Sauerstoff- und Kohlendioxidatmosphäre, der Luftfeuchte und der Temperatur sowie der Verwendung einer Biomatrix dargelegten Kultivierungsbedingungen vor teilhaft ergänzt. Insgesamt werden somit Bedingungen ge- 35 schaffen, unter denen das Wachstum der Krebszellen geför-

dert und das der Normalzellen und Kontaminanten wesentlich eingeschränkt oder sogar vollständig ausgeschaltet wird.

5

Weitere vorteilhafte Verfahrensmerkmale ergeben sich aus den Unteransprüchen. So wurde beispielsweise gefunden, daß die Tumorzellen in Anwesenheit von Erythrozyten, die unmittelbar von der Entnahmestelle der Gewebeprobe am Patienten stammen, besonders schnell wachsen und eine höhere „Angehrate“ besitzen als Zellen, die nur im reinem Zellkulturmedium zum Wachstum gebracht werden. Darüber hinaus hat es sich als vorteilhaft erwiesen, wenn die Gewebeprobe mindestens 2 Stunden, aber nicht länger als 24 Stunden, bei etwa 4°C bis 12°C in einem Zellkulturmedium aufbewahrt wird, um bereits jetzt an das Zellkulturmedium, in dem später die Vermehrung der Krebszellen erfolgen soll, angepaßt zu werden. Unter den aufgeführten Verfahrensbedingungen ist eine Adhäsion der Tumorzellen aus den aufbereiteten Gewebefragmenten an einer Biomatrix in der Zellkulturflasche bereits nach 1 bis 12 Stunden zu verzeichnen, sofern eine dem Gewebeentnahmeart identische Kulturtemperatur eingestellt wird.

25

Mit der vorliegenden und weiter unten in einem Ausführungsbeispiel detailliert beschriebenen Erfindung wird somit ein Verfahren zur Vermehrung von Tumorzellen in vitro angegeben, mit dem in einem vergleichsweise kurzen Zeitraum bei allen Tumorarten eine Kultivierung von aus Humangewebe gewonnenen Zellen mit einer „Angehrate“ von 100 % gelingt. Gegenüber der auf der Nacktmaus (Xenotransplantat) erzielten Zellvermehrung, bei der Angehraten von etwa 50 % erzielt werden, werden nicht nur Tierversuche vermieden und Kosten gespart, sondern es ist auch eine drastische Verkürzung der für die Vermehrung

35

des Zellmaterials benötigten Zeit zu verzeichnen, die gegenüber einem Zeitraum von mehreren Wochen oder gar Monaten beim Tumorwachstum in vivo bei dem erfindungsgemäß vorgeschlagenen Verfahren in der Regel bei lediglich 1 - 10 Tagen liegt.

Dadurch ist es erstmals möglich, Routineuntersuchungen für die Verlaufskontrolle von Krebserkrankungen und für prädiaktive Zwecke (Sensibilitätstest mit Strahlen, Chemotherapie, Hyperthermie) oder zur Früherkennung von Resistenzen zur Identifikation neuer Antikrebswirkstoffe, als Ergänzung für zytologische oder histopathologische Gewebefunde und in der Grundlagenforschung auf einfache und reproduzierbare Weise schnell und kostengünstig durchzuführen.

Nach einem weiteren Merkmal der Erfindung ist zur erfindungsgemäß orts aufgelösten Aufbereitung der Gewebeprobe als entscheidende Voraussetzung für die erfolgreiche Zellvermehrung eine Vorrichtung gemäß den Merkmalen des Anspruchs 9 vorgesehen. Diese Vorrichtung besteht zum einen aus einem Schneidapparat zum sequentiell-parallelen Teilen der Gewebeprobe und zum anderen aus einem Zerkleinerungsgerät zur weiteren Aufarbeitung der mit dem Schneidapparat hergestellten Gewebesegmente. Bei den in diesen Vorrichtungen durchgeführten Schneidvorgängen werden die jeweiligen Gewebestücke und -flüssigkeiten, die von verschiedenen Stellen der heterogenen Gewebeprobe stammen, voneinander getrennt in der Vorrichtung gehalten und können somit selektiv für die Zellvermehrung eingesetzt werden.

35

Der Schneidapparat umfaßt im wesentlichen eine in Kammern eingeteilte Auffangschale mit einer auf dieser beweglich angebrachten Schneidplatte sowie einen Schneidmesserrahmen. In der Schneidplatte in vorgegebenen Abständen ausgebildete Schneidrinnen, die im Schneidbereich zur Auffangschale hin offen sind, liegen jeweils oberhalb einer Kammer. Im Schneidmesserrahmen sind Schneidmesser oder Schneiddrähte in einem Abstand angebracht, der mit dem zwischen den Schneidrinnen übereinstimmt. Durch das Schneiden der auf der Schneidplatte liegenden Gewebeprobe jeweils im Bereich einer Schneidrinne wird ein sauberes Abtrennen der Gewebesegmente erreicht, und gleichzeitig gelangen Reststücke und Gewebeflüssigkeit in die unterhalb der Schneidrinne liegende Kammer.

Zur weiteren Aufbereitung der Gewebesegmente ist ein Zerkleinerungsgerät vorgesehen, das aus einer in Kammern geteilten Flüssigkeits-Auffangschale, einer auf dieser lösbar angebrachten Aufbereitungsplatte mit Vertiefungen zur Aufnahme der Gewebesegmente und einzelnen oder in einer Halteplatte drehbar und längsbeweglich angeordneten Drehstempeln mit an deren Stirnseite befestigten Messern besteht. Mit diesem Gerät werden die zur Zellvermehrung letztlich eingesetzten kleinen Gewebefragmente erzeugt. Die gleichfalls verwendbare, bei dem Schneidvorgang entstehende Gewebeflüssigkeit gelangt über in den Vertiefungen ausgebildete Löcher in die jeweils darunterliegende Kammer in der Flüssigkeits-Auffangschale und wird ebenfalls zur Zellvermehrung verwendet.

Weitere Merkmale und vorteilhafte Weiterbildungen der erfindungsgemäßen Vorrichtung ergeben sich aus den übrigen Unteransprüchen.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung wird nachfolgend beschrieben, wobei hinsichtlich der Zellvermehrung in vitro auf die beigefügte Tabelle, in der die Zusammensetzung des verwendeten Zellkulturmediums wiedergegeben ist, und hinsichtlich der Aufarbeitung der Gewebeproben auf die beigefügte Zeichnung Bezug genommen wird. In der Zeichnung zeigen:

Fig. 1

eine auseinandergezogene perspektivische Ansicht einer Schneidvorrichtung zur erfindungsgemäßen sequentiell-parallelen Aufbereitung einer Gewebeprobe;

Fig. 2

eine auseinandergezogene perspektivische Darstellung einer Vorrichtung zur weiteren Aufbereitung der in der Vorrichtung nach Fig. 1 hergestellten Gewebesegmente für die Zellvermehrung in vitro;

Fig. 3

eine Schnittansicht einer Auffangschale längs der Linie B-B in Fig. 1;

Fig. 4

einen senkrechten Schnitt durch eine Schneidplatte im Bereich einer Schneidrinne längs der Linie A-A in Figur 1; und

Fig. 5

eine Querschnittsansicht der Vorrichtung nach Fig. 2 in zusammengebautem Zustand.

Die vom Patienten in Form einer Feinnadel-bzw. Stanz-Biopsie entnommene Gewebeprobe liegt als Gewebestanzzy-
linder vor, kann aber auch ein nach anderen Verfahren ge-
wonnenes kleines Gewebefragment oder ein Gewebestück un-
terschiedlicher Form und Größe sein. Die Gewebeprobe mit
5 den an dieser haftenden, von der Entnahmestelle der Probe
am Patienten stammenden Erythrozyten wird für den Trans-
port zum Untersuchungsort in einem Zellkulturmedium bei
Temperaturen zwischen 2°C und 12°C aufbewahrt, und zwar
10 für einen Zeitraum von mindestens 2 Stunden, maximal je-
doch 24 Stunden. In diesem Zeitraum werden mechanische
Belastungen des Gewebestücks vermieden. Das Gewebestück
kann sich dabei bereits an das auch zur Zellvermehrung
später benutzte Zellkulturmedium mit gleicher Zusammen-
15 setzung anpassen, wobei die oben angegebenen Temperaturen
besonders günstig sind.

Die Aufarbeitung der Gewebeprobe für die Zellkultivierung
20 erfolgt mit den in der Zeichnung dargestellten Vorrich-
tungen.

Die Vorrichtung zum sequentiell-parallelen Teilen der Ge-
webeprobe in Abschnitte von bestimmter, vorgegebener Län-
ge und zum Separieren dieser Abschnitte bzw. von Bestand-
teilen derselben umfaßt eine Auffangschale 1, eine auf
der Auffangschale 1 gehaltene Schneidplatte 2 und einen
Schneidmesserrahmen 3. Die Schneidplatte 2 ist in fünf
30 Abschnitte gleicher Breite eingeteilt. In jedem Abschnitt
befinden sich jeweils in unterschiedlichem Abstand ange-
ordnete Schneidrinne 4, die in ihrem mittleren Bereich
zur Auffangsschale 1 hin offen sind. Die Schneidrinne 4
sind in den fünf Abschnitten jeweils im Abstand von 1 mm,
35 2 mm, 3 mm, 5 mm und 1 mm angeordnet. In Längsrichtung
der Schneidplatte ist in deren mittlerem Bereich eine

aufgerauhte Auflagefläche 5 ausgebildet, um die darauf liegende Gewebeprobe 6 bei einem Schneidvorgang zu fixieren. In diesem Bereich sind die Schneidrinne 4 nach unten offen. Die Schneidplatte 2 ist in zwei an den Längsseiten der Auffangschale 1 angebrachten Führungsschienen 7 verschiebbar gehalten. Die Schneidrinne 4 in der Schneidplatte 2 setzen sich in Einschnitten 8 in den Führungsschienen fort.

Die Auffangschale 1 ist entsprechend den in der Schneidplatte 2 vorgesehenen Rinnenabschnitten durch Trennwände 12 in fünf Kammern 1a - 1e geteilt, wobei den Schneidrinne durch weitere Zwischenwände in den betreffenden Kammern 1a, 1b, 1c und 1e jeweils Unterkammern 1a1 bis 1a9, 1b1 bis 1b4, 1c1 bis 1c3 und 1e1 bis 1e9 zugeordnet sind. Die Unterkammern sind zur exakten örtlichen Zuordnung der einzelnen Gewebeprobesegmente 6a oder Gewebeprobenreste bzw. Gewebeflüssigkeit entsprechend unterschiedlich markiert.

Der Schneidmesserrahmen 3 besteht aus einem Deckel oder Halterahmen mit an dessen Deckplatte befestigten Schneidmessern 10. Anstelle der Schneidmesser 10 können zwischen den Rahmenseiten auch Schneiddrähte gespannt sein. Die Schneidmesser 10 sind im gleichen Abstand wie die Schneidrinne 4 in der Schneidplatte angeordnet. Der Schneidmesserrahmen 3 ist so dimensioniert bzw. die Schneidmesser 10 sind so angeordnet, daß die Schneidelemente über bzw. in den Schneidrinne 4 und Einschnitten 8 hin- und herbewegt werden können. Der Schneidmesserrahmen 3 kann an einer Längsseite der Auffangschale 1 gelenkig befestigt sein, und zwar so, daß er in der auf der Schneidplatte 2 befindlichen Lage dennoch quer zur Gewe-

beprobe bewegt werden kann, um die Probe an den Schnittstellen sauber zu durchtrennen.

5 In Abhängigkeit von der Länge der Gewebeprobe und dem gewünschten Schnittabstand wird die Gewebeprobe 6 auf die aufgerauhte Auflage 5 der Schneidplatte 2 gelegt. Durch Hin- und Herbewegen des auf die Gewebeprobe gelegten (geklappten) Schneidmesserrahmens 3 wird das Präparat im
10 Bereich der Schneidrinnen 4 durchtrennt. Beim Schneiden entstehende Flüssigkeit fließt über die im Bereich der Auflagefläche 5 der Schneidplatte 2 in den Schneidrinnen 4 vorgesehenen Öffnungen 4a in die jeweils darunter liegende Unterkammer. Die aufgefangene Flüssigkeit kann
15 ebenso für die Zellvermehrung genutzt werden wie die abgetrennten Probensegmente, die entweder auf der Schneidplatte 2 liegenbleiben oder durch die Öffnung 4a in der Schneidrinne 4 in die darunterliegende Unterkammer fallen.

20

Mit der beschriebenen Vorrichtung gemäß den Figuren 1,3 und 4 können in den vorgegebenen Abmessungen präzise und gleichmäßige sowie glatte Schnitte ohne Beschädigung des
25 Probenmaterials reproduzierbar ausgeführt werden. Die Zellvermehrung erfolgt somit aus einer entsprechend der Heterogenität des dem Patienten entnommenen Gewebestücks durch die Segmentierung örtlich aufgelösten Gewebeprobe. Dadurch wird der störende Einfluß von Normalzellen und
30 Kontaminanten auf das Wachstum der Tumorzellen zurückgedrängt bzw. ausgeschaltet (Selektion). Außerdem kann auch die beim Schneiden der Gewebeprobe ortsaufgelöst entstehende Gewebeflüssigkeit, die wichtige Stammzellen enthält, für die Zellvermehrung genutzt werden. Im Ergebnis
35 der sich an die unten beschriebene weitere Aufbereitung der Gewebeprobe anschließenden Zellvermehrung in vitro

können Aussagen über die Struktur der heterogen ausgebildeten Gewebeprobe, über die Anordnung des Tumorkerns oder die Malignität getroffen werden. Schließlich ist die Herstellung der Probensegmente mit der jeweiligen Ortsauflösung auch reproduzierbar, so daß verlässliche Aussagen über den Verlauf der Erkrankung oder die Wirkung therapeutischer Maßnahmen getroffen werden können.

10 In einer Ausführungsvariante der oben beschriebenen Schneidvorrichtung kann das Durchtrennen der Gewebeprobe auch mit einem separaten Messerstempel (nicht dargestellt) erfolgen, an dem die Schneidmesser oder Schneiddrähte in einem Abstand angebracht sind, der mit dem zwischen den Schneidrinnen 4 übereinstimmt.

In den Figuren 2 und 5 ist eine Vorrichtung zur weiteren Aufbereitung der ortsaufgelöst zur Verfügung gestellten Probensegmente 6a oder von Reststücken wiedergegeben. Bei dieser Vorrichtung ist eine Flüssigkeits-Auffangschale 13 durch senkrechte Trennwände 11 in mehrere Kammern 13a bis 13e aufgeteilt. In zwei am oberen Rand der Flüssigkeits-Auffangschale 13 gegenüberliegend angebrachten Führungsschienen 14 ist eine Aufbereitungsplatte 15 mit in dieser im Abstand eingeformten Vertiefungen 16 gehalten. Die Vertiefungen 16 weisen am Boden kleine Löcher 17 auf. In der in die Führungsschienen 14 vollständig eingeschobenen Lage der Aufbereitungsplatte 15 liegen die Vertiefungen 16 jeweils über einer Kammer 13a bis 13e. Die zuvor abgetrennten Probensegmente 6a der Gewebeprobe 6 werden in die Vertiefungen 16 gelegt und mit an einem Drehstempel 18 befestigten Drehstempelmesser 19 weiter zerkleinert. Vorzugsweise sind 2 oder mehrere Drehstempelmesser 19 an der Stirnseite des Drehstempels angeordnet. Das Zerkleinern der Probensegmente 6a erfolgt bei leichtem Druck und

gegebenenfalls gleichzeitigem Hin- und Herdrehen des Drehstempels 18.

5 Wie Fig. 2 zeigt, können auch mehrere Drehstempel 18 in einer Halteplatte 20 drehbeweglich und heb- und senkbar gehalten sein. Der Abstand zwischen den Drehstempeln 18 entspricht dem der Vertiefungen 16 in der Aufbereitungsplatte 15.

10

Nach der weiteren Teilung der Probensegmente 6a stehen deren Teilstücke (Gewebefragmente) und die bei diesem Trennvorgang entstehende Gewebeflüssigkeit, die über die 15 Löcher 17 in den Vertiefungen 16 in die Kammern 13a bis 13e gelangt, für die Zellvermehrung zur Verfügung.

Die in den Figuren 1 bis 5 dargestellten Vorrichtungen 20 zum ortsaufgelösten, sequentiell-parallelen Schneiden und weiteren Aufbereiten der Gewebeprobe bestehen aus einem bis 121°C beständigen, zur Behandlung im Autoklav geeigneten Material, vorzugsweise Teflon, Metall oder Plastik. Für die Schneidmesser wird vorzugsweise Glas verwendet.

25

Die einzelnen Teilstücke und die jeweilige Gewebeflüssigkeit der ortsaufgelöst hergestellten Probensegmente 6a werden nun separat in einzelne, mit dem gleichen Zellkulturmedium, in dem sich bereits die dem Patienten entnommene Gewebeprobe 6 befand, gefüllte Zellkulturflaschen eingebracht. Das verbleibende Zellkulturmedium, in dem die Gewebeprobe nach der Probenahme aufbewahrt wurde, wird ebenfalls in eine Zellkulturflasche gefüllt. Die 30 Zellkulturflaschen sind jeweils mit einer Biomatrix, hier Collagen oder Polylysin beschichtet. Die Zusammensetzung

35

des hier für die Zellvermehrung in vitro eingesetzten Zellkulturmediums ist in der nachfolgenden Tabelle wiedergegeben:

5 **Anorganische Salze**

	Ca(NO ₃) ₂	50 mg/L
	CaCl ₂ • 2 H ₂ O	132 mg/L
	Kcl	400 mg/L
	MgSO ₄ • 7 H ₂ O	150 mg/L
10	NaCl	6400 mg/L
	NaHCO ₃	2100 mg/L
	Na ₂ HPO ₄	400 mg/L

15 **Aminosäuren**

	L-Arginin • 4 HCl	110 mg/L
	L-Asparagin (freie Base)	38 mg/L
	L-Asparaginsäure	23 mg/L
	L-Cystin	31 mg/L
20	L-Glutaminsäure	25 mg/L
	L-Glutamin	296 mg/L
	Glycin	13 mg/L
	L-Histidin (freie Base)	12 mg/L
	L-Hydroxyprolin	10 mg/L
25	L-Isoleucin	38 mg/L
	L-Leucin	38 mg/L
	L-Lysin • HCl	35 mg/L
	L-Methionin	12 mg/L
	L-Phenylalanin	16 mg/L
30	L-Prolin	22 mg/L
	L-Serin	26 mg/L
	L-Threonin	22 mg/L
	L-Tryptophan	5 mg/L
	L-Tyrosin	19 mg/L
35	L-Valin	22 mg/L
	L-Alanin	10 mg/L

Vitamine

	Biotin	0,6 mg/L
	D-Ca-Pantothenat	0,7 mg/L
5	Cholinchlorid	3,5 mg/L
	Folsäure	1,0 mg/L
	i-Inositol	35,9 mg/L
	Nicotinamid	1,0 mg/L
	Pyridoxal • HCl	1,0 mg/L
10	Riboflavin	20 µg/L
	Thiamin • HCl	1,0 mg/L
	Para-Aminobenzoessäure	500 µg/L
	Vitamin B ₁₂	5 µg/L
	Niacin	25 µg/L
15	Ascorbinsäure	50 µg/L
	Folinsäure	6 µg/L
	Liponsäure	21 µg/L
	Vitamin A (Acetat)	100 µg/L
	Pyridoxin • HCl	25 µg/L
20	Niacinamid	25 µg/L
	α-Tocopherolphosphat	10 µg/L

Weitere Komponenten

25	D-Glucose	1750 mg/L
	Phenolrot	7 mg/L
	Glutathion (reduziert)	0,5 mg/L
	Na-Pyrovat	1 mM
	Epidermaler Wachstumsfaktor	
30	(Epidermal Growth Factor, EGF-rekombinant	250 ng/L
	Fötale Rinderserum (FBS)	12,5 %
	Insulin vom Rind (Lyophilisat)	8 mg/L (26 U/mg)
35	Antibiotika nach Stand der Technik.	

Die mit einer Biomatrix beschichteten Zellkulturflaschen mit dem erfindungsgemäßen Zellkulturmedium und den in diesem befindlichen, nach dem zuvor beschriebenen Aufbereitungungsverfahren hergestellten kleinen Gewebefragmenten bzw. der Gewebeflüssigkeit werden anschließend in einen Brutschrank eingebracht und dort bei einer Temperatur zwischen 30°C und 36,5°C, einer Sauerstoffatmosphäre von 0,01 bis 3 %, einer Kohlendioxidatmosphäre von 0,1 bis 5 % und einer Luftfeuchte von 100 % aufbewahrt. Die genaue Temperatur richtet sich nach der Temperatur, die bei der Entnahme der Gewebeprobe gemessen wurde.

Bereits nach 1 bis 12 Stunden erfolgt eine Adhäsion der Tumorzellen an das Biomatrixsubstrat in der Zellkulturflasche. Etwa 24 Stunden nach der Erstetablierung der Kultur wird nach erfolgter Zelladhäsion das in den Zellkulturflaschen befindliche Medium gegen ein frisches Zellkulturmedium, das die gleiche Zusammensetzung wie das erste aufweist, ausgetauscht. Weitere Medienwechsel werden - je nach Präsenz von Kontaminanten - in der ersten Woche durchgeführt. Nachdem die Tumorzellen nach einer Ruhephase etabliert sind und sich vermehren, werden sie in einem von Antibiotika freien Medium gehalten. Daraufhin wird die Massenvermehrung initiiert.

Durch die oben beschriebene frühzeitige Teilung der Gewebeprobe nach 2 bis 24 Stunden in separate Gewebesegmente bzw. noch kleinere Gewebefragmente ist die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination und einer Massenvermehrung von Kontaminanten in den Kulturflaschen gering. Dennoch vereinzelt aufgefundene Kulturflaschen mit hoher Kontaminationsbelastung werden verworfen. Bei einer durch technische Fehler bedingten starken Vermehrung von Normalzel-

len, die zu einem Überwachsen der Tumorzellen führen,
kann auch eine Magnetseparation durchgeführt werden, wor-
aufhin unter den oben angegebenen Kulturbedingungen ein
selektives Wachstum der malignen Zellen gewährleistet
5 ist.

Bezugszeichenliste

5	1	Auffangschale
	1a1 bis 1a10	Unterkammern
	1b1 bis 1b5	Unterkammern
	1c1 bis 1c3	Unterkammern
	1d	
10	1e1 bis 1e10	Unterkammern
	2	Schneidplatte
	3	Schneidmesserrahmen
	4	Schneidrinnen
	4a	Öffnung in 4
15	5	Auflagefläche
	6	Gewebeprobe
	6a	Probensegment
	7	Führungsschiene
	8	Einschnitte
20	10	Schneidmesser/Schneiddrähte
	11	Trennwand
	12	Trennwand
	13	Flüssigkeitsauffangschale
	13a bis 13e	Kammern
25	14	Führungsschienen
	15	Aufbereitungsplatte
	16	Vertiefungen
	17	Löcher
	18	Drehstempel
30	19	Drehstempelmesser
	20	Drehstempel-Halteplatte

Patentansprüche

- 5
1. Verfahren zur Kultivierung von Krebszellen aus Human-
gewebe für molekularbiologische Reihenuntersuchungen,
dadurch gekennzeichnet, daß eine Gewebeprobe (6) auf
10 der Grundlage ihrer heterogenen Struktur in bezug auf
Tumorzellen, Normalzellen und Kontaminanten durch ei-
ne sequentiell-parallele Teilung in Scheibensegmente
örtlich aufgelöst wird und die einzelnen Gewebepro-
bensegmente separiert und weiter in Gewebefragmente
15 geteilt werden und die gewonnenen kleinen, separier-
ten Gewebefragmente und Gewebeflüssigkeiten der orts-
aufgelösten Gewebeprobensegmente (6a) in einem be-
stimmten Zellkulturmedium unter vorgegebenen Kultur-
bedingungen selektiv zum Wachstum gebracht werden.
- 20 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet,
daß die Gewebeprobe aus Feinnadel-, Aspirations- und
intraoperativem Biopsien oder einer Resektatprobe ge-
wonnen wird und zusammen mit den an der Gewebeprobe
haftenden Erythrozyten aus dem Bereich der Entnahme-
25 stelle der Probe an dem betreffenden Patienten vor-
übergehend in ein Zellkulturmedium eingebacht wird.
- 30 3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet,
daß das Zellkulturmedium zur zwischenzeitlichen Auf-
bewahrung der frischen Gewebeprobe mit dem Vermehrung
der Tumorzellen vorgesehenen Zellkulturmedium iden-
tisch ist.
- 35

4. Verfahren nach Anspruch 2 und 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeprobe (6) zur Anpassung an das Zellkulturmedium in diesem mindestens 2 Stunden, jedoch nicht länger als 24 Stunden bei einer Temperatur zwischen 4°C und 12°C verbleibt.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die aus den ortsaufgelösten Gewebeprobensegmenten(6a) erzeugten Gewebefragmente und -flüssigkeiten separat in mit einer Biomatrix beschichteten und mit dem Zellkulturmedium gefüllten Zellkulturflaschen unter einer Sauerstoffatmosphäre von 0,01 bis 3 % und einer Kohlendioxidatmosphäre von 0,1 - 5 % sowie bei einer Luftfeuchte von 100 % und Temperaturen zwischen 30°C und 36,5°C kultiviert werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine bestimmte Zeit nach der Erstetablierung der Kultur und erfolgter Zelladhäsion das Zellkulturmedium in der Kulturflasche gegen ein neues, jedoch mit gleicher Zusammensetzung ausgetauscht wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium in Abhängigkeit von der Präsenz von Kontaminanten, wie Bakterien oder Pilze, bei gleichbleibendem oder verringertem Anteil an Antibiotika ausgetauscht wird.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Zellkulturmedium aus anorganischen Salzen, nämlich

21

	Ca (NO ₃) ₂	10-100	mg/L
	CaCl ₂ • 2H ₂ O	80-150	mg/L
	KCl	200-1000	mg/L
5	MgSO ₄ • 7H ₂ O	200-700	mg/L
	NaCl	3000-10000	mg/L
	NaHCO ₃	1500-4000	mg/L
	Na ₂ HPO ₄	100-1000	mg/L;
10	Aminosäuren, nämlich		
	L-Arginin • 4 HCl	10-500	mg/L
	L-Asparagin (freie Base)	10-500	mg/L
15	L-Asparaginsäure	10-500	mg/L
	L-Cystin	10-500	mg/L
	L-Glutaminsäure	10-500	mg/L
	L-Glutamin	10-500	mg/L
	Glycin	10-500	mg/L
20	L-Histidin (freie Base)	10-500	mg/L
	L-Hydroxyprolin	10-500	mg/L
	L-Isoleucin	10-500	mg/L
	L-Leucin	10-500	mg/L
	L-Lysin • HCl	10-500	mg/L
25	L-Methionin	10-500	mg/L
	L-Phenylalanin	10-500	mg/L
	L-Prolin	10-500	mg/L
	L-Serin	10-500	mg/L
	L-Threonin	10-500	mg/L
30	L-Tryptophan	10-400	mg/L
	L-Tyrosin	10-500	mg/L
	L-Valin	10-500	mg/L
	L-Alanin	10-300	mg/L
35	Vitaminen, nämlich		

22

	Biotin	0,01-10	mg/L
	D-Ca-Pantothanat	0,01-10	mg/L
	Cholinchlorid	0,1-50	mg/L
	Folsäure	0,01-10	mg/L
5	i-Inositol	0,1-100	mg/L
	Nicotinamid	0,01-10	mg/L
	Pyridoxal • HCL	0,01-10	mg/L
	Riboflavin	0,1-100	µg/L
	Thiamin • HCL	0,1-50	mg/L
10	Para-Aminobenzoesäure	1-1000	µg/L
	Vitamin B ₁₂	1-1000	µg/L
	Niacin	1-100	µg/L
	Ascorbinsäure	1-5000	µg/L
	Folinsäure	1-100	µg/L
15	Liponsäure	1-100	µg/L
	Vitamin A (Acetat)	10-1000	µg/L
	Pyridoxin • HCL	1-100	µg/L
	Niacinamid	1-100	µg/L
	α-Tocopherolphosphat	0-1000	µg/L
20	sowie		
	D-Glucose	100-5000	mg/L
	Phenolrot	0,1-1000	mg/L
25	Glutathion (reduziert)	0,01-10	mg/L
	Na-Pyruvat	0,1-50	nM
	Epidermaler Wachstumsfaktor (Epidermal Growth Factor, EGF)		
	-rekombinant	1-3000	ng/L
30	Fötales Rinderserum (FBS)		
	Insulin vom Rind (Lyophilisat)	0,1-50	mg/L

und Antibiotika zusammengesetzt ist.

9. Vorrichtung zur Durchführung des Verfahrens nach Anspruch 1, zur orts aufgelösten Aufbereitung der Gewebeprobe, gekennzeichnet durch einen Schneidapparat zum sequentiell-parallelen Zerteilen der Gewebeprobe (6) in einzelne, voneinander getrennte Gewebesegmente (6a) und der entsprechenden Schnittstelle zugehöriger Gewebeflüssigkeit, bestehend aus einer in Kammern mit Unterkammern (1a1 bis 1a10, 1b1 bis 1b5, 1c1 bis 1c3, 1d und 1e1 bis 1e10) aufgeteilten Auffangschale (1), einer auf dieser lösbar gehaltenen Schneidplatte (2) mit zur Auffangschale (1) hin teilweise offenen Schneidrinnen (4) sowie einem Schneidmesserrahmen (3) für Schneidmesser (10), wobei die Anordnung der Schneidmesser (10) im Schneidmesserrahmen (3) mit der der Schneidrinnen (4) in der Schneidplatte (2) übereinstimmt und jeder Schneidrinne (4) eine sich unter dieser befindenden einzelnen Unterkammer zugeordnet ist; sowie ein Zerkleinerungsgerät zur weiteren Aufbereitung der orts aufgelösten Gewebeprobensegmente (6a), die eine in Kammern (13a bis 13e) aufgeteilte Flüssigkeits-Auffangschale (13), eine auf dieser lösbar angebrachte Aufbereitungsplatte (15) mit Vertiefungen (16) sowie Drehstempel (18) mit Drehstempelmessern (19) umfaßt, wobei die Vertiefungen (16) Löcher (17) aufweisen und sich jeweils oberhalb einer Kammer (13a bis 13e) befinden und die Drehstempel (18) den Vertiefungen (16) zugeordnet sind.
10. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) eine senkrecht zu den Schneidrinnen (4) verlaufende und mittig angeordnete aufgerauhte Auflagefläche (5) zur stabilen Lagerung der Gewebeprobe (6) aufweist.

24

11. Vorrichtung nach Anspruch 9 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidrinnen (4) im Bereich der Auflagefläche (5) zu der darunterliegenden Unterkammer hin offen sind, so daß beim Schneiden gebildete Gewebeflüssigkeit oder Gewebestücke getrennt in der jeweiligen Unterkammer aufgefangen werden.
12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Breite der Schneidrinnen (4) größer als die Stärke der Schneidmesser (10) ist.
13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) an einer Deckplatte des Schneidmesserrahmens (3) befestigt sind.
14. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 9 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidmesser (10) in dem Schneidmesserrahmen (3) verspannte Schneiddrähte bilden.
15. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Schneidplatte (2) und die Aufbereitungsplatte (15) jeweils in Führungsschienen (7 bzw. 14) an der Auffangsschale (1) bzw. der Flüssigkeits-Auffangsschale (13) gehalten sind, wobei in den Führungsschienen (7) für die Schneidplatte (2) mit den Schneidrinnen (4) fluchtende Einschnitte (8) ausgebildet sind.

25

16. Vorrichtung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Drehstempel (18) in Bohrungen einer Drehstempel-Halteplatte (20) in senkrechter Richtung bewegbar sowie drehbar angeordnet sind.

5

10

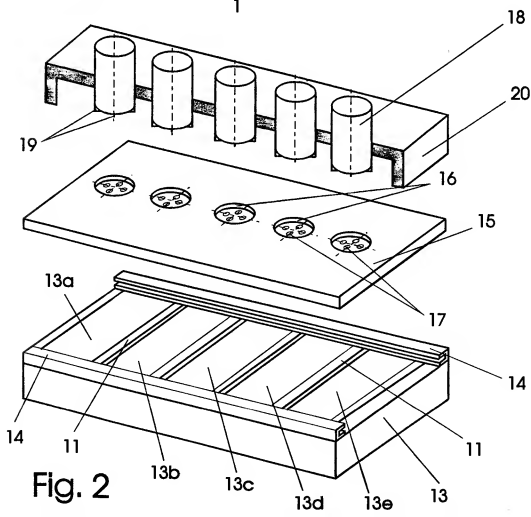
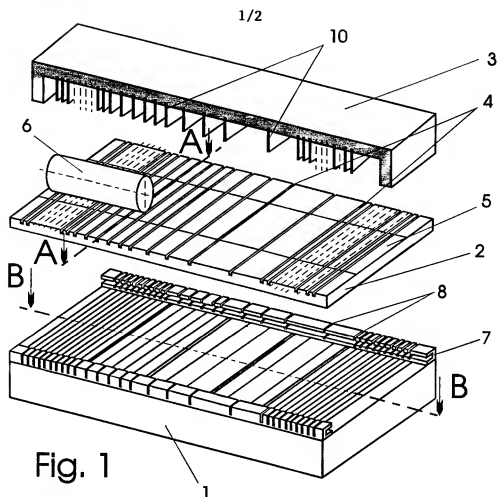
15

20

25

30

35



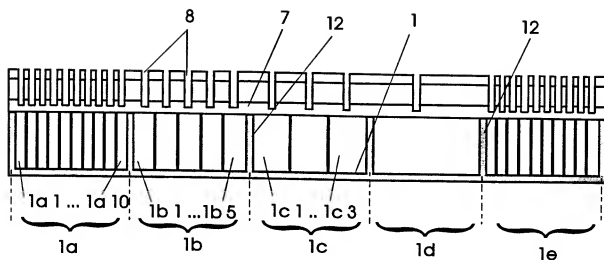


Fig. 3

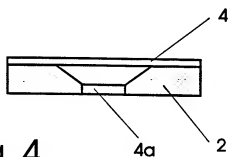


Fig. 4

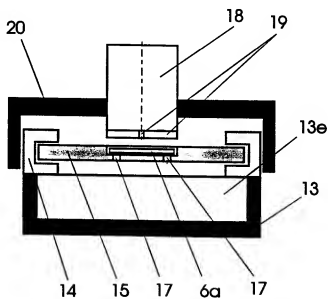


Fig. 5